

心筋内ミオグロビンに対するアルコール摂取の影響

—マウス心筋における免疫組織学的検討—

鳥居 尚志

アルコール性心筋症の発生機序については不明な点が多い。ミオグロビン (Mb) は心筋細胞内で主に酸素の運搬と貯蔵を行い、その代謝にとって重要な働きをしている。前回、剖検心を用いた研究で、長期間のアルコール摂取が心筋細胞の Mb を障害する可能性があることを報告した。本研究では、心筋細胞の Mb に対するアルコールの影響を検討するために、マウス心筋を用いて心筋細胞の Mb 染色性の変化を免疫組織学的に検索した。

ICR 系マウスを対象とし、以下のような急性および慢性投与実験を行った。急性投与実験では、33%エタノール (EtOH) を一度に腹腔内投与し (0.015ml/g weight), その後数回継続的に心筋細胞の Mb 染色性の変化を検索し、あわせて血清および心筋組織内 EtOH 濃度の変化をガスクロマトグラフィーにより検討した。慢性投与実験では、10% EtOH を長期間経口摂取させた後に、心筋細胞の Mb 染色性を非 EtOH 投与群と比較検討した。

Mb 染色用には抗マウス Mb 家兎血清 (IgG) を使用した。顕微鏡用の Mb 染色は、マウス心筋のホルマリン固定・パラフィン切片を用い、ペルオキシダーゼ酵素抗体間接法によって行った。また、電顕用の Mb 染色は超薄切片上で protein-A 金コロイド法によって行った。

急性投与実験では、心筋組織内 EtOH 濃度が最高に達した時期 (EtOH 投与後 1~2 時間) に心筋細胞の Mb 染色性が低下し、それは心筋組織内 EtOH 濃度の下降と相関して回復した。電顕的にも同時期に、心筋細胞の金粒子沈着の数が明らかに減少した。慢性投与実験では、EtOH 投与群と非投与群との間で心筋細胞の Mb 染色性に有意差がなかった。

以上の結果より、EtOH またはその代謝産物が心筋細胞の Mb 抗原性に一時的な影響を与えることが明らかになり、それはさらに何らかの Mb 代謝障害につながる可能性が示唆された。

(平成 2 年 10 月 11 日採用)

Effect of Alcohol Administration on the Myoglobin of the Myocardium —Immunohistochemical Study on the Myocardium of Mice—

Takashi Torii

The etiology of alcoholic cardiomyopathy remains unknown. Myoglobin plays an important role in the metabolism of muscle cells, by which oxygen is transported and stored intracellularly. In a previous study, after examining human autopsy cases, I reported that long-term alcohol intake might disturb the myoglobin in myocardial cells. The present study was carried out to elucidate the effects of alcohol administration on the myoglobin in myocardial cells of ICR strain mice.

Short- and long-term alcohol administration studies were done as follows.

In the short-term administration study, the myoglobin stainability of the myocardial cells was examined several times after infusion of 33% ethanol (0.015 ml/g weight) into the intraperitoneal cavity of the mice. Serum and the intramyocardial ethanol concentration were also measured by gas chromatography.

In the long-term administration study, the myoglobin stainability of the myocardial cells was examined after long-term per os intake of ethanol.

For immunohistochemical study, myoglobin was stained on formalin-fixed paraffin sections from the left ventricular myocardium by the indirect immunoperoxidase method, using anti-mouse Mb rabbit serum (IgG). For electron microscopic study, myoglobin was stained on ultrathin sections by the protein A-colloidal gold method.

In the short-term administration study, the myoglobin stainability of the myocardial cells clearly decreased at one and two hours after the ethanol infusion, when the intramyocardial ethanol concentration reached its maximum value. The myoglobin stainability recovered to the normal level as the intramyocardial ethanol concentration decreased. The electron microscopic study demonstrated a definitive decrease in the number of immunoreactive particles deposited within the myocardial cells at one and two hours after the ethanol infusion.

In the long-term administration study, there was no significant difference in the myoglobin stainability of myocardial cells among the alcohol and the non-alcohol control groups.

The results of the present study showed that alcohol or its metabolites cause a transient alteration of the myoglobin antigenicity in mouse myocardial cells. The results also suggested the possibility that the transient alteration of the myoglobin antigenicity by alcohol-intake eventually lead to some disturbance of the myoglobin metabolism. (Accepted on October 11, 1990) *Kawasaki Igakkaishi* 16 (3・4): 221-229, 1990

Key Words ① Alcoholic cardiomyopathy ② Myoglobin
③ Immunohistochemical study

はじめに

近年アルコール消費量の増加に伴い、アルコールに起因する臓器障害や代謝異常に対する関心が高まっている。心筋に対する障害は、アルコール性心筋症あるいはアルコール性心筋障害と呼ばれているが、その発生機序は不明な点が多い。

ミオグロビン (Mb) は筋組織中に存在するヘム蛋白で、分子量はヘモグロビン (Hb) の約1/4の17,500である。Mbの酸素結合能はHbより強く、筋組織中でHbから酸素を受け取って運搬、貯蔵し、エネルギー産生系へ供給するといわれている。^{1), 2)} Mbは心筋組織にも同様に存在

し、心筋の代謝や運動にとって重要な働きをしている。³⁾したがって、何らかの原因で筋組織のMbに異常が生じれば、いろいろな筋・心筋障害を起こす可能性があり、もしアルコールによってこの心筋内Mbに異常が生じれば、そのことがアルコール性心筋症の発症に関与する可能性が考えられる。

前回、剖検心を用いた研究で、長期のアルコール摂取によって心筋細胞のMbに何らかの障害を生じる可能性があることを報告した。⁴⁾本研究では、心筋細胞のMbに対するアルコールの影響を明確に示すことを目的として、アルコール投与マウスの心筋を用い、心筋細胞のMb染

色性を免疫組織学的に検索した。

対 象 と 方 法

マウス (ICR 系・10週齢・雄) を対象とし、アルコールはエタノール (EtOH) を使用した。心筋細胞の Mb 染色性に対するアルコール摂取の影響を検討するために、EtOH を一度に大量投与した急性投与実験と、EtOH を長期摂取させた慢性投与実験を行った。

急性投与実験：I～VII群、各10匹のマウスに33% EtOH (0.015 ml/g weight) を一度に腹腔内投与し、その後体重・心重量を計測し、心筋と血液を採取した。EtOH 投与から試料採取までの時間はI群30分、II群1時間、III群2時間、IV群4時間、V群6時間、VI群12時間、VII群24時間とした。EtOH 非投与マウス10匹をコントロール群とした。

慢性投与実験：I～III群、各13匹のマウスを給水なしで10% EtOH と固形飼料で飼育し、コントロール群13匹は水と固形飼料で飼育した。飼育期間はI群3か月、II群6か月、III群9か月、コントロール群9か月とし、飼育終了後にそれぞれ体重・心重量を計測し、心筋を採取した。

免疫組織学的検索：マウス Mb の抽出はヒト Mb の抽出法⁵⁾ を参考にして以下の方法で行った。

- ①凍結・解凍したマウスの心筋と横紋筋をホモジネート
- ②純水を加えて一晩放置後に遠心
- ③その上清を50%飽和硫酸で透析し再び遠心
- ④その可溶成分を Sephadex G-50 でゲル濾過
- ⑤溶出ピークを等電電気泳動で再分離

上記の方法で抽出した Mb を抗原とし、MBL 社に依頼して抗マウス Mb ウサギ IgG を作製した。なお、抗体の特異性の検定はオクタロニー法で行い、抽出した Mb と作製した抗体との間に1本の沈降線を確認した。

光顕用の Mb 染色は、左室壁を含む10%ホルマリン固定・パラフィン切片を用い、ペルオキ

シダーゼ酵素抗体間接法によって行った。Mb 染色結果は、左心室の心内膜側半 (ED) と心外膜側半 (EP) において、それぞれ次の基準で判定し、C レベルの場合に心筋細胞の Mb 染色性が低下したと判断した。

A レベル：心筋細胞はほぼ均一によく染色され



Fig. 1. Indirect peroxidase staining for myoglobin in the myocardium of a ICR strain mouse showing level A-staining. The majority of myocardial cells are well and uniformly stained. Non-alcohol control group ($\times 200$)

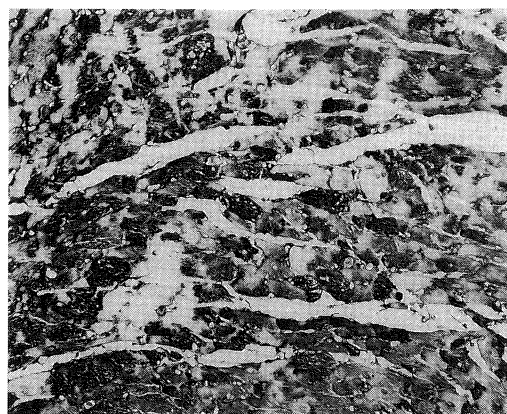


Fig. 2. Indirect peroxidase staining for myoglobin in mouse myocardium showing level B-staining. Small numbers of myocardial cells are unstained in irregular patterns. Group III at two hours after intraperitoneal infusion of ethanol ($\times 200$)

る (Fig. 1).

B レベル: Mb 染色性の低下した心筋細胞が中等度混在する (Fig. 2).

C レベル: Mb 染色性の低下した心筋細胞が多数混在する (Fig. 3).

電顕用の Mb 染色は、超薄切片上で protein-A 金コロイド法⁶⁾ によって行った。心筋組織の固定は4%パラホルムアルデヒドと1%グルタルアルデヒドの混合液で行い、包埋剤は LR-White resin⁷⁾ を用いた。

EtOH 濃度測定: 心筋組織内濃度は心筋組織をホモジネート後に遠心分離して得られた上清を用い、また血中濃度は血清を用いて、それぞれガスクロマトグラフィーで測定した。

以上の方法により急性投与実験と慢性投与実験につき、それぞれ心筋細胞の Mb 染色性をアルコール群とコントロール群で比較検討し、一部については電顕的にも細胞内 Mb 染色性とその局在について検討した。また急性投与実験では、血中・心筋組織内 EtOH 濃度と Mb 染色性との関連をあわせて検討した。

結 果

急性投与実験: マウス心重量と体重は、I～VII群とコントロール群の間で差がなかった (Table 1)。I～VII群とコントロール群における Mb 染色性の比較では、ED と EP どちらかで C レベルであった頻度がコントロール群 (10例中0例) より多かったのはII群とIII群で、それぞれ10例中5例(50%)と10例中7例(70%)であった (Table 2)。ED と EP で Mb 染色性を比べると、ED ではII群とIII群、EP ではIII群でそれぞれ C レベル

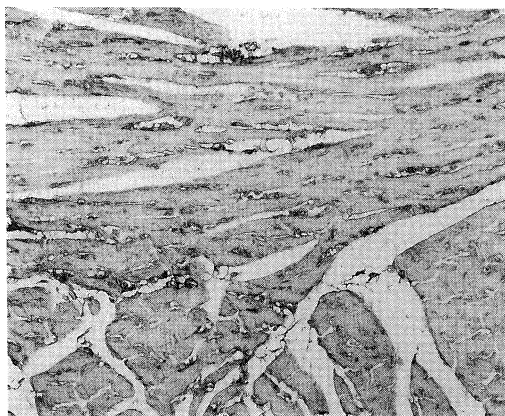


Fig. 3. Indirect peroxidase staining for myoglobin in mouse myocardium showing level C-staining. Large numbers of myocardial cells are generally unstained. Group III at two hours after ethanol infusion ($\times 200$)

Table 1. Measurements of mice in long- and short-term ethanol administration studies

Long-term study			Body weight (g)	Cardiac weight (mg)	CW/BW (%)
Group	Period				
I	n=13	3 mo. ⁽¹⁾	m 45.8	m 232	0.51
II	n=12	6 mo. ⁽¹⁾	m 46.0	m 231	0.50
III	n=10	9 mo. ⁽¹⁾	m 44.5	m 248	0.56
Control	n=10	9 mo.	m 48.0	m 237	0.49
Short-term study			Body weight (g)	Cardiac weight (mg)	CW/BW (%)
Group	Time ⁽²⁾				
I	n=10	30 min.	m 37.8	m 158	0.42
II	n=10	1 hr.	m 37.2	m 162	0.44
III	n=10	2 hrs.	m 39.4	m 168	0.43
IV	n=10	4 hrs.	m 39.0	m 173	0.44
V	n=10	6 hrs.	m 39.8	m 183	0.46
VI	n=10	12 hrs.	m 37.1	m 166	0.45
VII	n=10	24 hrs.	m 38.8	m 168	0.43
Control	n=10		m 37.5	m 170	0.45

CW/BW = Cardiac weight/body weight ratio, m = mean,
 (1) = Duration of alcohol intake (2) = Time after alcohol infusion
 Control = Non-alcohol group

Table 2. Immunohistochemical staining of myocardial myoglobin in the short-term ethanol administration study

Group	Staining level		
	A (%)	B (%)	C (%)
I n=10	1 (10)	8 (80)	1 (10)
II n=10	0 (0)	5 (50)	5 (50) *
III n=10	0 (0)	3 (30)	7 (70) *
IV n=10	0 (0)	8 (80)	2 (20)
V n=10	3 (30)	7 (70)	0 (0)
VI n=10	2 (20)	7 (70)	1 (10)
VII n=10	2 (0)	8 (80)	0 (0)
Control n=10	3 (30)	7 (70)	0 (0)

* = $P < 0.05$

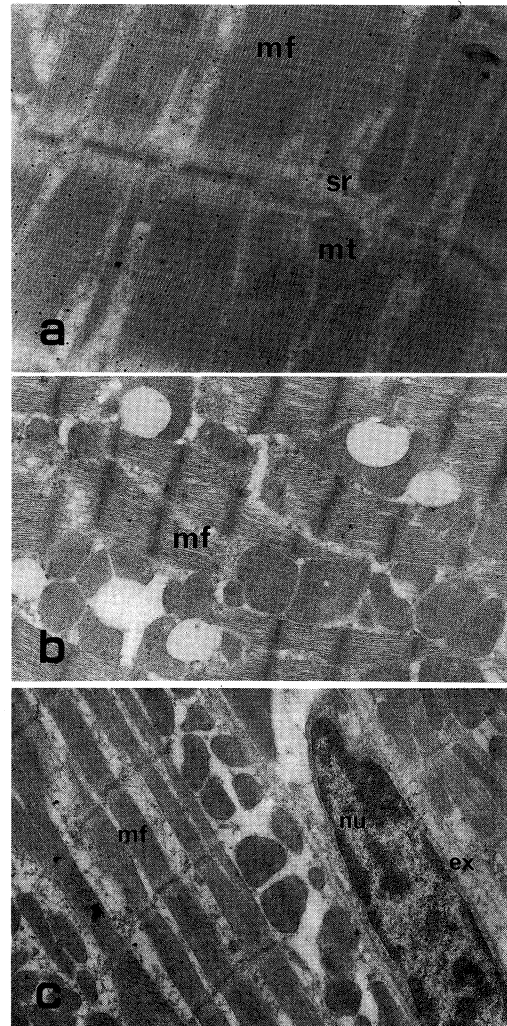
A=The majority of myocardial cells were uniformly well-stained. B=Small numbers of myocardial cells were unstained. C=Large numbers of myocardial cells were unstained.

Table 3. Immunohistochemical staining of myocardial myoglobin in two different portions in the short-term ethanol administration study

Group	Portion examined and staining level					
	Ed			Ep		
	A	B	C	A	B	C
I n=10	1	8	1	4	6	0
II n=10	0	5	5 *	1	5	4
III n=10	0	3	7 *	1	4	5 *
IV n=10	0	8	2	3	6	1
V n=10	3	7	0	4	6	0
VI n=10	2	7	1	5	5	0
VII n=10	2	8	0	6	4	0
Control n=10	3	7	0	5	5	0

* = $P < 0.05$

A=The majority of myocardial cells were uniformly well-stained. B=Small number of myocardial cells were unstained. C=Large numbers of myocardial cells were unstained. Ed=Endocardial half of the left ventricular wall. Ep=Epicardial half of the left ventricular wall.

**Fig. 4.** Immunoelectron micrograph of myocardial cells showing myoglobin localization as revealed by the protein A-colloidal gold method.

a : Gold particles are diffusely present over the myofibrils (mf). Smaller numbers of gold particles are present over the mitochondria (mt) and the sarcoplasmic reticulum (sr). Non-alcohol control group ($\times 30,000$).

b : A few gold particles are occasionally present over the myofibrils (mf). Group III at two hours after ethanol infusion ($\times 16,000$).

c : Very small numbers of gold particles are present over the myofibrils (mf) and the nucleus (nu), while no particles are present extracellularly (ex).

Group III at two hours after ethanol infusion ($\times 12,000$)

の頻度がコントロール群より多かった。EPとEDにおけるMb染色性には明らかな差異はなかった(**Table 3**)。電顕的には、コントロール群では心筋細胞内に筋原線維上にほぼ均一に金粒子が認められ、特定部位への集積はなかったが、ミトコンドリア、筋小胞体および核では、筋原線維に比べて金粒子沈着の数が少なかった(**Fig. 4a**)。II・III群では筋原線維の融解と錯走傾向およびミトコンドリアの空胞化がみられ、金粒子の数が著明に減少していた(**Fig. 4b**)。金粒子は核内に集積することなく、また細胞外間質には認められなかった(**Fig. 4c**)。

血中EtOH濃度はEtOH投与後30分で最高(454 ± 39 mg/dl)に達し、その後漸減して12時間後に0 mg/dlとなった(**Fig. 5**)。心筋組織内EtOH濃度は血中濃度より少し遅れて1時間後に最高(1.54 ± 0.25 mg/g)に達し、その後漸減して12時間後に0 mg/gとなった(**Fig. 5**)。

慢性投与実験：実験期間中に死亡したマウスを除き、I群13匹、II群12匹、III群10匹とコントロール群10匹について検討した。マウス1匹

の10% EtOH摂取量は1日平均3 mlで、体重60 kgの人に換算して日本酒1.5升到相当する量であった。I・II・III群とコントロール群で体重と心重量を比較すると、III群では平均心重量と心重量/体重比がコントロール群より増加する傾向があったが有意差はなかった(**Table 1**)。I・II・III群とコントロール群におけるMb染色性の比較では、EDとEPどちらかでCレベルであったのはI群は13例中1例(8%)、II群は12例中2例(17%)、III群は10例中2例(20%)で、これら3群ともにコントロール群の10例中1例(10%)と比べてCレベルの頻度に有意差がなかった。また心筋の部位別に検討しても、I・II・III群とコントロール群のMb染色性に差がなかった(**Table 4**)。電顕的にはIII群で心筋細胞内に軽度の空胞化が散見されたが、同様の变化はコントロール群でもみられ、Mb染色性とその局在にも変化はなかった。

考 察

急性投与実験における心筋細胞のMb染色性の变化と、心筋組織内EtOH濃度の変化を対応

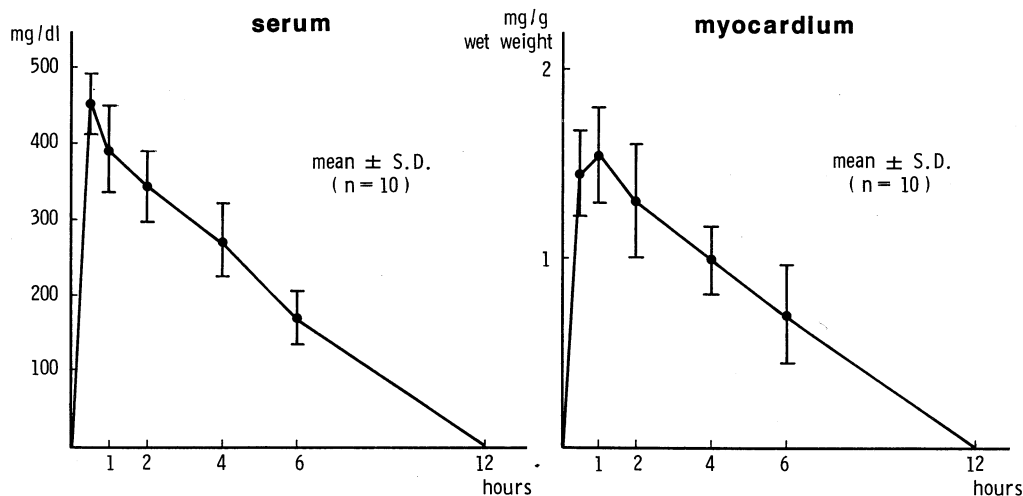


Fig. 5. Changes in serum and intramyocardial ethanol concentration after rapid ethanol infusion into the peritoneal cavity of ICR strain mice

Table 4. Immunohistochemical staining of myocardial myoglobin in the long-term ethanol administration study

Group	Staining level		
	A (%)	B (%)	C (%)
I n=13	7 (54)	5 (38)	1 (8)
II n=12	6 (50)	4 (33)	2 (17)
III n=10	3 (30)	5 (50)	2 (20)
Control n=10	4 (40)	5 (50)	1 (10)

Group	Portion examined and staining level					
	Ed			Ep		
	A	B	C	A	B	C
I n=13	7	5	1	8	4	1
II n=12	7	3	2	7	4	1
III n=10	3	5	2	4	5	1
Control n=10	4	5	1	6	4	0

A=The majority of myocardial cells were uniformly well-stained. B=Small numbers of myocardial cells were unstained. C=Large numbers of myocardial cells were unstained. Ed=Endocardial half of the left ventricular wall. Ep=Epicardial half of the left ventricular wall.

させると、Mb 染色性は EtOH 投与後早期 (30 分後) には変化せず、組織内 EtOH 濃度が最高に達した時期 (1~2 時間後) に低下した。その後 EtOH 濃度の下降に伴って Mb 染色性は回復した。このことは、高濃度の EtOH が心筋細胞内 Mb に何らかの影響を与えた結果、Mb 染色性が低下した可能性を示唆し、その Mb 染色性の低下は可逆性であった。血中 EtOH 濃度は 400 mg/dl 以上まで上昇したが、これは人に換算すると呼吸抑制が起きる濃度である。このような高濃度の EtOH に曝露されても、心筋細胞の Mb 染色性の低下は可逆性で、心筋細胞の壊死は認めなかった。

Mb は正常でも血中に少量ずつ遊出し、肝臓や腎臓で分解されると推定されている。⁸⁾ 一方、Mb は心筋細胞が壊死に陥ると CPK などの酵素と同様に大量に血中に遊出することが知られ、⁹⁾ 臨床的にも心筋梗塞の早期診断に用いられている。Kent^{10),11)} は、虚血発生後の心筋細胞の Mb 染色性を検討している。その結果、虚血発生から 30 分~1 時間後に Mb の細胞質から核内への拡

散と間質への遊出がみられ、4 時間後には Mb は細胞内から消失したとしている。一般に、心筋細胞は 30 分以上の血流遮断によって不可逆性障害を生じるとされている¹²⁾ ので、この場合は心筋細胞の壊死によって Mb が遊出したために Mb 染色性が低下したものと思われる。逆に、心筋細胞が不可逆性の障害を生じなければ Mb 染色性が低下するほど大量の Mb の遊出は起こらないと考えられる。急性投与実験において、EtOH 投与後にみられた心筋細胞の Mb 染色性の低下は可逆性であり、Mb の核内への拡散や細胞外への著明な遊出はなく、心筋細胞の壊死もみられなかった。したがって、EtOH 投与後の心筋細胞の Mb 染色性の低下の機序については、虚血による変化とは異なり、Mb が高濃度の EtOH またはその代謝産物にさらされた結果、Mb 抗原性が一時的に失活ないしは変貌したために生じた可能性が考えられる。この Mb 抗原性変化の機序は不明であるが、EtOH によって Mb の立体構造の変化が起こり、それに続発して発生した可能性が考えられる。そして EtOH 濃度の下降に伴って Mb の立体構造と抗原性が回復し、心筋細胞の Mb 染色性が回復したものと考えた。

上述のように、EtOH による心筋細胞の Mb 染色性の低下は虚血性心筋障害の場合とは発生機序が異なるようであるが、これまでの報告^{13),14)} によると、アルコール性心筋障害による組織学的変化は非特異的で、虚血性心筋障害による変化と似ている。本研究においても、Mb 染色性の低下がみられた例で電顕的に筋原線維の融解と錯走傾向およびミトコンドリアの空胞化が認められたが、これらの変化は虚血早期の心筋細胞にもみられることが知られている。¹⁵⁾ アルコール性心筋障害において、心筋細胞内の Mb に異常があるならば心筋細胞は酸素の取り込み、運搬および貯蔵を円滑に行えなくなると考えられる。そうすると循環障害はなくても細胞レベルで心筋虚血が生じ、結果的には冠動脈疾患に伴う虚血性心筋障害と同様の組織学的変化が起きるものと推察することができる。

心筋には一定量の Mb が存在し (人では 2.9

mg/g wet weight), 1心拍毎に酸素化・脱酸素化を繰り返している。¹⁶⁾ 田村ら¹⁷⁾ は、周期的な酸素化・脱酸素化を繰り返している Mb は全量の15~20%で、残りの Mb で酸素供給の低下や酸素消費量の増加に対応しているとしている。さらに彼らは、全 Mb 量の約80%が不活化された時に心筋組織の酸素不足が生じることを示している。本研究において Mb 染色性が C レベルの場合、Mb が染まらない心筋細胞が多数存在したので、心筋組織に重篤な酸素欠乏が起こっていたと考えられる。したがって、反復性のアルコール負荷が原因のアルコール性心筋障害では、慢性的な心筋虚血が生じるものと考えられる。このような状態では、心筋細胞は Mb の障害以外にも既知の種々の代謝障害や変性^{18)~20)} を来し、最終的にはアルコール性心筋症と呼ばれる状態が生じるものと思われる。

本研究においては、ED と EP の間で Mb 染色性に違いがなかった。ヒト剖検心における Mb 染色性の検討⁴⁾ では、飲酒歴のある群で ED の Mb 染色性が EP の Mb 染色性よりも低下していた。EtOH またはその代謝産物が直接 Mb に与える影響は ED と EP において大差ないと思われる。しかし心筋の解剖学的特徴(ED では EP よりも心筋内圧が高く、冠血流が末梢性であるので、虚血時の血流調節予備能が低い) から続発する心筋細胞内虚血は、一般に ED のほうが強くなると考えられる。急性投与実験のように1回だけの EtOH 負荷であれば問題はないが、負荷が繰り返されると ED ではより強い虚血が繰り返起きることになり、当然 Mb に対する影響も ED において強くなり、Mb 染色性が低下する可能性が考えられる。

慢性投与実験においては、マウス1匹の EtOH 摂取量は心筋障害を起こすのに十分な量と思われたが、EtOH を摂取した群とコントロール群の間で心筋細胞の Mb 染色性に有意差がなかった。その理由としては、EtOH 摂取時に相当量が漏れたために実際の摂取量はもっと少なかった可能性があることと、1回の EtOH 摂取量が少ないためにすばやく肝臓で分解されて、血中 EtOH

濃度が心筋細胞内 Mb に影響を与えるレベルにまでは達しなかった可能性が考えられる。また ICR 系のマウスを用いたが、マウスの種類によってアルコール嗜好性が異なることが知られており、²¹⁾ アルコール摂取量やその耐性も異なる可能性がある。したがって、EtOH 摂取の方法を工夫したり、使用するマウスの種類を十分考慮する必要があったものと思われる。

以上より、大量のアルコールを急性投与した場合、アルコールまたはその代謝産物は心筋細胞内 Mb の抗原性に一時的な影響を与えることが明らかになった。そしてこの可逆性変化が反復されることによって不可逆性になり、さらに Mb 代謝自体になんらかの恒常的な障害を発生するに至れば、それがアルコール性心筋症の発生に関与しうる可能性が示唆された。しかしながら、アルコールが心筋細胞の Mb にどのような影響を与えるのか具体的には明らかでない。今後、Mb に対するアルコールの影響を詳細に知ることができれば、アルコール性心筋症の発生機序を解明する上で一つの重要な手掛かりが得られるかもしれない。

おわりに

心筋細胞の Mb に対するアルコールの影響を検討するために、マウスを用いて心筋細胞の Mb 染色性を免疫組織学的に検索した。心筋組織内 EtOH 濃度の上昇時に心筋細胞の Mb 染色性が低下し、またその変化は可逆性であったことから、EtOH またはその代謝産物が心筋細胞内の Mb に何らかの影響を与える可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた川崎医科大学附属川崎病院病理部 伊藤慈秀教授に深甚なる謝意を表するとともに、本研究に御協力いただいた川崎医科大学学生化学教室 井内岩夫教授、日高和夫助手に深謝します。また、御助言、御協力をいただいた川崎医科大学附属川崎病院病理部 水島睦枝講師をはじめ病理検査部の各位に感謝します。さらに技術的援助をいただいた中田敬一氏、内藤達夫氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Theorell, H. : Kristallinisches myoglobin. *Biochem. Z.* 268 : 73—82, 1934
- 2) Rossi-Fanelli, A. and Antonini, E. : Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* 77 : 478—492, 1958
- 3) Åkeson, Å., Björck, G. and Simon, R. : On the content of myoglobin in human muscles. *Acta Med. Scand.* 183 : 307—316, 1968
- 4) 鳥居尚志：心筋内ミオグロビン代謝に対するアルコール摂取の影響。Ⅰ．剖検心における免疫組織学的検討。川崎医学会誌 15 : 415—421, 1989
- 5) 川井尚臣：CM-Sephadex C-50カラムクロマトグラフィーによる人骨格筋ミオグロビンの抽出分離。四国医誌 24 : 703—714, 1968
- 6) Bendayan, M., Nanci, A. and Kan, F. W. K. : Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 35 : 983—996, 1987
- 7) Newman, G. R. and Hobot, J. A. : Modern acrylics for post-embedding immunostaining techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 35 : 971—981, 1987
- 8) 川井尚臣：ラジオイムノアッセイによる人ミオグロビンの turnover. 昭和55年度厚生省筋ジストロフィー症の病因に関する臨床的研究報告。1980
- 9) Grenadier, E., Keidar, S., Kahana, L., Alpan, G., Marmur, A. and Palant, A. : The roles of serum myoglobin total CPK, and CK-MB isoenzyme in the acute phase of myocardial infarction. *Am. Heart J.* 105 : 408—416, 1983
- 10) Kent, S. P. : Diffusion of myoglobin in the diagnosis of early myocardial ischemia. *Lab. Invest.* 46 : 265—270, 1982
- 11) Kent, S. P. : Intracellular diffusion of myoglobin. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 108 : 827—830, 1984
- 12) Jennings, R. B. : Symposium on the prehospital phase of acute myocardial infarction. Part II. Early phase of myocardial ischemic injury and infarction. *Am. J. Cardiol.* 24 : 753—765, 1969
- 13) Hibbs, R. G., Ferrans, V. J., Black, W. C., Weilbaecher, D. G., Walsh, J. J. and Burch, G.E. : Alcoholic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 69 : 766—779, 1965
- 14) 伊藤順通, 庄司宗介, 桐林 香：急性アルコール中毒家兎心筋の形態学的変化。Jpn. J. Stud. Alcohol 1 : 265—274, 1966
- 15) Jennings, R. B., Baum, J. H. and Herdson, P. B. : Fine structural changes in myocardial ischemic injury. *Arch. Pathol.* 79 : 135—143, 1965
- 16) Millikan, G. A. : Muscle hemoglobin. *Physiol. Rev.* 19 : 503—523, 1939
- 17) 田村 守, 押野 臨：ミオグロビンの生理的意義。生物物理 16 : 1—13, 1976
- 18) Lieber, C. S., Spritz, N. and DeCarli, L. M. : Accumulation of triglycerides in heart and kidney after alcohol ingestion. *J. Clin. Invest.* 45 : 1041, 1966
- 19) Pachinger, O. M., Tillmanns, H., Mao, J. C., Fauvel, J. M. and Bing, R. J. : The effect of prolonged administration of ethanol on cardiac metabolism and performance in the dog. *J. Clin. Invest.* 52 : 2690—2696, 1973
- 20) Sarma, J. S. M., Ikeda, S., Fischer, R., Maruyama, Y., Weishaar, R. and Bing, R. J. : Biochemical and contractile properties of heart muscle after prolonged alcohol administration. *J. Mol. Cell Cardiol.* 8 : 951—972, 1976
- 21) 伊藤 直：2種の異なったマウスにおけるアルコール依存性と離脱症状の発現について。(第1報) 行動及び電気生理学的変化について。Jpn. J. Alcohol and Drug Dependence. 18 : 184—202, 1983